



TITLE:

# コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47の機能制御：骨形成不全症 を引き起こすHsp47変異体の解析 及びHsp47阻害剤の同定( Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

伊藤, 進也

---

CITATION:

伊藤, 進也. コラーゲン特異的分子シャペロンHsp47の機能制御：骨形成不全症を引き起こすHsp47変異体の解析及びHsp47阻害剤の同定. 京都大学, 2016, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19539>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2016-06-23に公開; 許諾条件により要旨は2016-06-23に公開; 許諾条件により本文は2019-09-01に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博 士 ( 理 学 )	氏 名	伊藤 進也
論文題目	コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の機能制御： 骨形成不全症を引き起こす Hsp47 変異体の解析及び Hsp47 阻害剤の同定		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>タンパク質はアミノ酸が連なったポリペプチド鎖が独自の正しい立体構造にフォールディングし、タンパク質として機能する。分子シャペロンはポリペプチド鎖と相互作用し、タンパク質の適切な構造へのフォールディングまたは立体構造の維持に働いている。コラーゲンはグリシンが3つおきに配置されるアミノ酸ユニット (Gly-X-Y) の繰り返し配列を有し、この領域が3つのコラーゲン分子間で3重らせん構造を形成する。コラーゲンの正しい3重らせん構造形成に必須なのがHeat shock protein 47 (Hsp47) というコラーゲン特異的分子シャペロンである。Hsp47は小胞体内で3重らせん構造のプロコラーゲンに結合し、その安定化に寄与している。Hsp47がコラーゲン合成に必須の分子シャペロンであることは、コラーゲンとHsp47の発現が常に強く相関すること、Hsp47を欠損したマウスが基底膜形成不全により胎生致死となること、Hsp47が欠損した線維芽細胞から分泌されたコラーゲンの3重らせん構造が緩んでいることなどから示されてきた。今回、Hsp47の分子シャペロンとしての機能とコラーゲン関連疾患に関する研究が行われた。</p> <p>近年、Hsp47の遺伝子変異がヒトやイヌで骨形成不全症 (OI) を引き起こすことが報告された。既に、Hsp47の2つのOI変異体は細胞内のHsp47のタンパク質量が少ないことが報告されている。mRNA量は変わらないため、それらは分解されていると考えられたが、2つのOI変異体で分解様式に関して差異が報告されていた。Hsp47の変異が如何に骨形成不全症の表現型につながるかという点を含め、Hsp47 OI変異体自身の分子の特性については、未だ明らかではなかった。Hsp47 OI変異体を研究するため、OI変異体をHsp47欠損線維芽細胞に発現させ、Hsp47変異体の可溶性及びコラーゲン結合能を調べた。Hsp47の2つのOI変異体はともに構造的に不安定であり、ユビキチンプロテアソーム系で分解されるため、Hsp47のタンパク質量が少ないことが分かった。また、OI変異体の可溶性は野生型よりかなり低いことが分かった。小胞体内のHsp47の量の減少だけではなく、コラーゲンの正しいフォールディングに必須となる分子シャペロンとしてコラーゲンに結合する能力の低下もまた骨形成不全症を引き起こす原因の一つであることが考えられた。</p> <p>線維化疾患はコラーゲンの異常蓄積を特徴とする疾患であり、慢性的な炎症によるコラーゲンの合成と分解の不均衡がコラーゲンの異常な蓄積を引き起こしている。Hsp47はコラーゲンの合成に特異的かつ必須であるため、線維化疾患の有効な分子標的である。Hsp47とコラーゲンの相互作用を阻害する低分子化合物の同定を目的に研究が行われた。化合物ライブラリーより <i>in vitro</i>でHsp47とコラーゲンの相互作用を阻害する化合物が共鳴プラズモン共鳴法により絞り込まれ、次に細胞外マトリックスへのコラーゲンの蓄積阻害する化合物が選ばれた。パルスチェイス法により、コラーゲンの分泌が阻害される化合物を最終的なヒット化合物とされた。その結果、直接Hsp47に結合し、コラーゲンとHsp47の相互作用を阻害する低分子化合物が同定された。この化合物は線維芽細胞でプロコラーゲンの分泌を阻害し、細胞外マトリックスでのコラーゲンの蓄積を著しく減少させた。Hsp47の結晶構造を基にしたシミュレーションとNMR測定から、得られた化合物はHsp47とコラーゲンの相互作用を競合阻害的に阻害することが分かった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

コラーゲン特異的分子シャペロンHsp47の機能制御を主題に研究が行われた。コラーゲンの特異的な分子シャペロンであるHsp47はコラーゲン分子の特徴である3重らせん構造に結合し、その形成及び安定化に寄与している。これまで、Hsp47がコラーゲンの合成に必須の分子シャペロンであることはHsp47ノックアウトマウスやHsp47欠損線維芽細胞を用いて示されていた。Hsp47が分子シャペロンとして機能するには、タンパク質量(量)とコラーゲンへの結合能力(質)が必要である。コラーゲンに関わる疾患と関連して、量と質という点からHsp47の分子シャペロンの機能を制御する研究が行われた。

骨形成不全症(OI)はコラーゲンの合成に関与する遺伝子の変異により骨が脆くなる先天性疾患である。Hsp47の変異がヒトやイヌで骨形成不全症を引き起こすことが報告されている。既にHsp47 OI変異体のタンパク質量が少ないことは報告されているが、Hsp47 OI変異体の分子シャペロンとしての質が変化しているかについて明らかではなかった。Hsp47 OI変異体の可溶性、コラーゲン結合能が調べられた結果、OIの変異によりHsp47は構造的に不安定な状態になり、プロテアソーム系により分解されることで、Hsp47の量が少なくなることが分かった。また、コラーゲンへの結合能も著しく減少することが示された。骨形成不全症を引き起こす原因はHsp47変異体のタンパク質量の少なさだけではなく、コラーゲンに結合する能力の減少という質の低下も要因の一つであることが考えられた。また、ケミカルシャペロン存在下で可溶性のHsp47 OI変異体の量は増加するが、結合する能力は上昇しないことが示された。

骨形成においてHsp47のシャペロンとしての機能は必須であるが、コラーゲンの異常蓄積を特徴とする線維化疾患では、Hsp47のシャペロン機能は疾患の悪化に寄与しており、Hsp47は線維化疾患治療の分子標的となっている。コラーゲンとHsp47の相互作用を阻害し、Hsp47の分子シャペロンとしての機能を阻害する低分子化合物を得る目的でスクリーニングが行われ、三段階のセレクションから、直接Hsp47に結合しコラーゲンとHsp47の相互作用を阻害する低分子化合物が同定された。得られた化合物は線維芽細胞で正しい構造のコラーゲンの分泌及び蓄積を抑制した。さらに、シミュレーションとNMRによるその検証から、Hsp47とコラーゲンの相互作用を低分子化合物が競合阻害的に阻害することが示された。

本研究には二つの研究上の意義が認められた。骨形成不全症の発症機序の理解が進んだこと、コラーゲンとその特異的な分子シャペロンの相互作用に関する理解が進んだことの二つである。Hsp47の変異により、Hsp47の量と質ともに分子シャペロンとしての機能が失われていることが骨形成不全症の原因になりうるということが分かり、また、低分子化合物を用いて、コラーゲンとHsp47の相互作用を阻害し、Hsp47の分子シャペロンとしての機能を阻害することが可能であることが分かった。

本研究は、分子シャペロンと疾患という研究分野において重要な進捗をもたらすもので、本質的な主題に沿って研究が行われた。研究の立案、遂行、解釈において、質、量ともに十分なものであった。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成28年1月13日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。